Action de quelques microbes pathogènes sur la Vipère Aspic et les Couleuvres Tropidonotes, et réaction de ces microbes aux venins de Vipère et de Cobra

par Mme Phisalix et M. A. Urbain.

Il est actuellement de notion courante que les organismes inférieurs, animaux ou végétaux, sont plus résistants aux venins et aux toxines qu'ils élaborent que les organismes supérieurs, Mammifères et Oiseaux [1].

Ce fait a été mis en évidence par l'observation et l'expérience pour un certain nombre de cas, et seulement admis pour la plupart des autres. Mais il n'a d'importance que si l'on en établit les causes et si on fixe les limites, car c'est de la connaissance de l'immunité naturelle des espèces, de ses mécanismes et de ses limites que résultent les moyens à employer pour créer l'immunité chez les espèces sensibles.

Notre étude, résumée en cette note, est une contribution à ce problème, en ce qui concerne la résistance des Serpents à sang venimeux (Vipère aspic, Couleuvres tropidonotes), à l'action de quelques microbes très pathogènes : *Pasteurella du chien*, *Bacille parathyphique*, B. *Charbon*, *Staphylocoque*, *Streptocoque*, et inversement, la résistance de ces microbes à l'action du sérum et des venins, qui sont des toxines renforcées, mais qui contiennent aussi des antitoxines et des antigènes multiples.

I. — Action de quelques microbes sur les serpents

Pasteurella canis. C. Phisalix, 1902.

La souche de Pasteurella que nous avons employée et que l'un de nous cultive depuis 1902, tue en 9 à 12 heures le jeune cobaye d'un poids de 250 à 300 gr., à la dose de 1 c. c. 50 dans le péritoine.

1. E. Grasset et A. Zoutendyk. — Immunological studies in Reptiles and their relation to apects of Immunity in higher animals. *(Publication of the Smith. African Inst. for Med. Researches* ; Johannesberg, 1931, t. IV, p.377-460.)
Id. — Sur les susceptibilités des Reptiles Sud-Africains aux venins de Vipères et des Colubridés. Sur le passage des antigènes et des anticorps dans les œufs de Reptiles. *(C. R. Soc. Biol.*, 1931, t. CVII, p. 1082 et 1278).

L'essai de la virulence de ce microbe sur les Serpents a été pratiqué sur des Vipères aspic *(Vipera aspis,* Lin.), et des Couleuvres tropidonotes, *(Tropidonotus natrix,* Lin. et *Tropidonotus viperinus,* Latr.), dont le sang et la salive parotidienne ont une action toxique de même ordre que le sang et le venin de Vipère aspic.

Action sur la Couleuvre à collier. — 7 sujets, dont le poids varie de 27 à 86 gr., donc des jeunes dans leur deuxième année, et des adultes, reçoivent chacun dans le péritoine 2 c. c. d'une culture de Pasteurella en bouillon peptoné. Suivant leur âge, ils meurent en 1-5 jours de septicémie à Pasteurella pure, sans hémorragies, mais avec une congestion pulmonaire intense.

Action sur la Vipère aspic. — La même dose de 2 c. c. de culture de 24 heures est inoculée dans le péritoine de trois vipères adultes : la première, pesant 55 gr., meurt en l'espace de 41 heures de septicémie pasteurellique pure ; les deux autres résistent et sont sacrifiées 16 jours après l'inoculation. A ce moment, le sujet n° 2, pesant 80 gr., est encore en puissance de septicémie. Quant au sujet n° 3, pesant 55 gr., comme le premier, il en est indemne : la Pasteurella qui l'infectait dans les 15 premiers jours a disparu de son sang dans cet espace de 26 jours.

Pour un même poids, 100 gr., d'animal inoculé, les doses de la même culture de Pasteurella qui tuent les Serpents sont donc de 3 à 12 fois plus élevées que celles nécessaires pour tuer le cobaye, et la durée de la survie est de 2 à 10 fois plus grande.

Pasteurella canis donne donc chez la Vipère et la Couleuvre à collier une septicémie, d'allure modérée, qui peut tuer les Serpents, mais en un temps assez long, et qui a une tendance à disparaître spontanément du sang.

Le microbe ayant passé par les Serpents a conservé sa virulence initiale vis-à-vis du cobaye, mais ses dimensions sont réduites de moitié, le sang circulant ne lui convient donc que médiocrement comme milieu de culture. Repiqué en bouillon, ou inoculé au cobaye, il reprend aussitôt ses dimensions et sa virulence primitives.

Bacille Paratyphique B.

Ce microbe provient d'un Macrorhine (Eléphant de mer) mort à Luna-Park. Il tue en 24 heures le cobaye de 250 gr. qui reçoit 1 c. c. d'une culture en bouillon, par la voie péritonéale.

Action sur la Vipère aspic et la Couleuvre à collier. — Ce microbe a, vis-à-vis des Serpents, une virulence très voisine de celle de la Pasteurella du chien.

2 c. c. de culture en bouillon de 24 heures, inoculés dans le péritoine d'une Vipère adulte, d'un poids de 70 gr., déterminent une septicémie d'intensité moyenne, tendant vers la guérison spontanée.

Le sang des sujets qui ont été sacrifiés 3 semaines après l'inoculation donne, en bouillon, une culture pure du microbe inoculé.

3 c. c. de la même culture, inoculée dans le péritoine, fait périr en 3 jours une Couleuvre à collier adulte pesant 55 gr. et en 14 jours une Vipère également adulte pesant 70 grammes. De même que pour la Pasteurella, la dose mortelle de culture de bacille paratyphique, âgée de 24 heures, est de 8 à 10 fois plus élevée pour les Serpents que pour le cobaye, et la durée de la survie, 3 à 14 fois plus grande.

La virulence du microbe, qui a passé par les Serpents, n'a pas été modifiée vis-à-vis du cobaye, mais ses dimensions se sont trouvées réduites, elles redeviennent normales dès le premier repiquage en bouillon, ou dès le premier passage chez le cobaye.

Bacille du Charbon.

La culture employée tue le cobaye de 250 gr. en l'espace de 36 à 48 heures, par inoculation sous-cutanée de 1/250e de c. c. de culture de 24 heures en bouillon ordinaire.

L'essai de sa virulence a été fait sur des Vipères et des Couleuvres tropidonotes de tous les âges, pesant de 20 à 30 gr. à partir de leur deuxième année. Pour déterminer la mort des sujets, il a fallu employer des doses bien supérieures à celles qui suffisent à tuer le cobaye : c'est ainsi que, une jeune Couleuvre à collier pesant 50 gr. résiste à l'inoculation dans le péritoine de 0 c. c. 50 d'une culture âgée de 24 heures ; mais elle présente pendant quelques heures des oscillations de la tête, des contractions du corps, dont la face ventrale ne quitte toutefois pas le plan du support, et une parésie de la région postérieure du corps. La septicémie a été constatée par des examens répétés du sang et par inoculation de celui-ci au cobaye.

Une jeune Couleuvre vipérine pesant 20 gr. (dans sa 2e année) a également résisté à l'inoculation dans le péritoine de 1 c. c. de la même culture ; sacrifiée au bout de 7 jours, le sang donnait une culture de bactéridies. Pour déterminer la mort chez une vipère adulte, il ne faut pas moins de 2 c. c. de culture de Charbon, inoculés dans la cavité péritonéale, le sujet meurt en l'espace de 8 jours ; à la dose de 3 c. c., la mort survient en 5 jours : cette dose est, pour 100 gr. de poids, de 400 à 1.250 fois plus élevée que pour le cobaye

La bactéridie charbonneuse ayant passé par l'organisme des Serpents, a conservé toute sa virulence ; par contre, ses filaments sont tellement amincis qu'ils semblent dédoublés. Mais comme il a été constaté pour les microbes précédents, le bacille récupère ses dimensions primitives à la première culture en bouillon, ou par le premier passage sur cobaye.

Staphylocoque.

La culture en bouillon du staphylocoque étudié, tue le lapin de 2.000 gr., par inoculation intra-veineuse, à la dose de 0 c. c. 10 en l'espace de 10 à 12 jours. La même culture inoculée à la dose de 1 c. c. dans le péritoine de la Vipère ou de la Couleuvre à collier, reste sans action sur les individus jeunes pesant de 20 à 25 gr. aussi bien que sur les adultes ; sacrifiées après 1 mois, leur sang ensemencé sur divers milieux de culture montre parfois du staphylocoque. Avec 2 c. c. de culture, la jeune Vipère âgée de 2 ans meurt en 7 heures de septicémie ; pour les sujets adultes, la dose doit être portée à 3 c. c. La mort survient en 22 heures ; les sujets présentent alors des phénomènes asphysiques, convulsifs (corps en opisthotones) dus en partie à une hémolyse progressive des hématies et qui devient totale au moment de la mort. En effet, non seulement la toxine staphylococcique agit sur le système nerveux, mais encore sur les globules rouges du sang, dont elle détruit le stroma. Cette action est très facilement suivie au microscope par des prélèvements au cours de l'infection.

Ce microbe ne subit pas de réduction de dimensions ; il conserve sa virulence initiale pour le lapin, après passage par l'organisme du serpent.

Streptocoque.

La culture en bouillon-sérum de 24 heures de ce streptocoque (souche Saint-Cyr), tue le cobaye de 250 gr., en 24-48 heures, par voie sous-cutanée, à la dose de 5 c. c. ; et en 24 heures, par la voie péritonéale, à la dose de 0 c. c. 10 ; par inoculation sous la peau, à la dose de 2 cent. cubes.

La septicémie déterminée chez les Serpents par ce streptocoque est d'allure modérée et prolongée ; elle a tendance à régresser spontanément et à guérir.

Chez les jeunes sujets, Vipères pesant de 25 à 30 gr., Couleuvres pesant 50 gr., la dose de 0 c. c. 50 de culture, inoculée dans la cavité péritonéale, ne détermine aucun changement apparent ; il en est de même avec la dose de 2 c. c. inoculée aux adultes. Néanmoins des prélèvements méthodiques de sang montrent qu'il y a septicémie et que celle-ci diminue graduellement pour disparaître à la longue.

Il faut 3 c. c. de culture pour tuer les Vipères adultes : c'est ainsi qu'une grosse femelle pesant 89 gr. présente le lendemain de l'inoculation des symptômes convulsifs discrets, des ondulations du corps accompagnées d'un glissement sur place, des vibrations de la queue ; l'animal meurt paralysé le 3e jour après l'inoculation.

A l'autopsie le corps est flasque, le cœur en relâchement complet, le poumon et l'intestin sont congestionnés. Le sang frais ou coloré

montre une phagocytose abondante. Ensemencé en bouillon-sérum, il donne une culture pure de streptocoque, ayant vis-à-vis du cobaye la même virulence que la culture originelle.

Les dimensions du microbe n'ont pas varié.

Les microbes dont nous avons essayé l'action ont tous une virulence marquée pour les Vertébrés supérieurs ; cette virulence est cependant moyenne pour les Serpents, dont le sérum et le venin sont susceptibles de détruire certains virus *in vivo* et *in vitro*, tels que le virus rabique : l'un de nous [1] a, en effet, montré que le sang et le venin de la Vipère aspic, le sang ou le sérum, de la Couleuvre à collier, du Hérisson, de l'Anguille, tuent *in vitro* le virus rabique, tout en conservant leurs antigènes propres et respectant ceux du virus.

II. — Action du sérum et des venins de serpents sur les microbes

1. — **Sérum**

De cette première série d'expériences, nous pouvons conclure, entre autres choses, que, *in vivo*, le sang circulant des Serpents n'empêche pas la septicémie, mais que, pour la produire, il faut des doses très supérieures à celles qui suffisent à tuer les animaux sensibles, et la durée de la survie est toujours plus longue, lorsqu'elle n'est pas totale. Le sang circulant est donc un milieu de culture assez peu favorable pour les microbes que nous avons étudiés, puisque ceux-ci tendent à en disparaître ; il paraît donc posséder à leur égard une certaine action bactériolytique ; en est-il de même *in vitro* ?

Pour le rechercher, nous avons employé pour chaque microbe la technique suivante :

Le tube 1 renferme 1 c. c. de bouillon (tube témoin).
Le tube 2 renferme 1 c. c. de sérum pur de Vipère ou de Couleuvre.
Le tube 3 renferme 0 c. c. 67 de sérum + 0 c. c. 33 de bouillon.
Le tube 4 renferme 0 c.îc. 50 de sérum + 0 c. c. 50 de bouillon.
Le tube 5 renferme 0 c. c. 33 de sérum + 0 c. c. 67 de bouillon.
Le tube 6 renferme 1 c. c. d'eau salée physiologique.

1. Mme Phisalix. Mécanisme de la résistance des Batraciens et des Reptiles au virus rabique. *(Bull. Mus. Hist. Nat.*, 1915, t. 21, p. 29.)
— Immunité naturelle de l'Anguille vis-à-vis du virus rabique et action rabicide de son sérum. *(C. R. Acad. Sc.*, 1926, t. 182, p. 182).
— Pouvoir rabicide du sang du Hérisson et pouvoir vaccinant contre l'inoculation intracérébrale de virus fixe du mélange neutre virus-sérum inoculé dans l'encéphale. *(C. R. Ac. Sc.*, 1926, t. 182, p. 288).
— Vaccination du lapin contre l'inoculation intra-cérébrale de virus rabique fixe par inoculation sous-cutanée des mélanges Virus-sérum de Vipère, de Couleuvre ou de Hérisson, puis de virus fixe. *(C. R. Ac. Sc.*, 1926, t. 182, p. 499.)
— Indépendance des propriétés antivenimeuses et des propriétés rabicides du sérum des Couleuvres dépourvues de glandes parotides venimeuses. *(Bull. Mus. Hist. Nat.*, Paris, 1923, t. 34, p. 79.)

Ces milieux sont réalisés avec les précautions aseptiques d'usage : en outre, leur stérilité est vérifiée par séjour à l'étuve pendant 48 heures à 37°. Chaque tube est ensuite ensemencé avec 2 gouttes du microbe à étudier, puis remis à l'étuve.

Pour les 5 espèces de microbes considérées : *Pasteurella canis Bac. Paratyphique B. Charbon, Staphylocoque* et *Streptocoque*, les résultats ont été concordants et peuvent se résumer comme il suit :

Les cultures sont positives dans tous les tubes, mais inégalement, c'est dans les tubes témoins qu'elles sont les plus abondantes, puis dans ceux des tubes à bouillon-sérum, plus tardivement ; en eau salée, envenimée à 1/1.000, où le microbe semble diminuer de longueur ; mais il y conserve plus longtemps encore sa vitalité, et cela sans perdre ses facultés de reprendre ses dimensions primitives en milieu ordinaire ; elles étaient encore intactes au bout de trois mois.

Le sérum de Serpents exerce donc *in vitro* comme *in vivo*, une certaine action empêchante, mais limitée, sur la prolifération des microbes très pathogènes.

2. — **Venin**

In vivo, le venin contenu dans une glande saine est aseptique, et les morsures venimeuses s'infectent rarement si elles sont préservées des souillures de l'air ; mais si la glande est le siège d'une inflammation, qui a généralement pour point de départ celle de la gaîne des crochets, le venin peut se peupler de divers microorganismes qui résistent fort bien à son action. On peut vérifier *in vitro* cette résistance et en fixer les limites.

La technique employée est analogue à celle que nous avons adoptée pour l'essai des sérums.

Pour chaque microbe et pour chaque venin (de Vipère ou de Cobra) une série de 7 tubes à hémolyse est employée pour réaliser des milieux ayant une teneur différente en venins :

Le tube 1 renferme 1 c. c. de bouillon (témoin).
Le tube 2 renferme 1 c. c. de bouillon + 0 c. c. 10 solution de venin à 1/10
Le tube 3 renferme 1 c. c. de bouillon + 0 c. c. 20 solution de venin à 1/10
Le tube 4 renferme 1 c. c. de bouillon + 0 c. c. 40 solution de venin à 1/10
Le tube 5 renferme 1 c. c. de bouillon + 0 c. c. 50 solution de venin à 1/10
Le tube 6 renferme 1 c. c. eau salée + 0 c. c. 10 solution de venin à 1/10
Le tube 7 renferme 1 c. c. eau salée + 0 c. c. 010 solution de venin à 1/10

Après vérification de la stérilité de ces mélanges par un séjour de 48 heures à l'étuve à 37°, ils sont ensemencés.

Comme avec les sérums, les résultats obtenus avec les venins sur la *Pasteurella du chien*, le *Bac. paratyphique B, le Charbon, le Staphylocoque* et le *Streptocoque*, sont concordants : les cultures

sont positives dans tous les tubes, plus abondantes en tubes témoins qu'en bouillon-venin et en eau salée envenimée.

Dans tous les milieux envenimés, les dimensions de la majorité des microbes étudiés se réduisent beaucoup ; les bâtonnets de charbon en particulier, semblent dédoublés ; la Pasteurella et le bac. Paratyphique B réduits de moitié, mais il suffit d'un repiquage en bouillon, ou d'un passage sur l'animal sensible, pour que le microbe revienne à ses dimensions premières. La virulence n'est pas modifiée ; mais ici une remarque s'impose quant à sa vérification : dans les milieux dont la teneur en venin est élevée (5 mmgr. par cent. cube par exemple) 1 goutte de culture renferme encore assez de venin pour dominer la virulence propre du microbe : il convient donc d'ensemencer cette culture avec un fil de platine simplement trempé dans la culture, et dans une quantité de bouillon assez grande ; on évitera ainsi de provoquer une intoxication par le venin lui-même.

Les microbes meurent plus rapidement en milieux nutritifs envenimés (bouillon-sérum ou bouillon-venin) qu'en bouillon ordinaire ou en eau salée semblablement envenimée.

Conclusions

1° *In vivo.* Pour déterminer une septicémie mortelle, ou simplement grave, chez les Serpents à sang venimeux, comme la Vipère aspic et les Vipères tropidonotes, il faut employer des doses de cultures très supérieures à celles qui suffisent à tuer les petits animaux de laboratoire. Les Serpents offrent donc une certaine résistance aux infections, résistance qui s'affirme encore par la longue durée de la septicémie et sa tendance spontanée à disparaître. Le sang venimeux et circulant des Serpents est donc un médiocre milieu de prolifération pour les microbes virulents que nous avons employés. Les Serpents à sang venimeux ne peuvent ainsi constituer des réservoirs de virus, ni contre les microbes ni contre la rage.

2° *In vitro*, ces microbes peuvent aussi résister aux milieux envenimés par les sérums ou par les venins ; mais cette résistance est limitée car au-dessus d'une certaine teneur en sérum ou en venin, le microbe cesse de proliférer, s'amenuise pour résister et finit par disparaître : ces sérums et venins ont donc la propriété de bactériolyser ces germes ; mais ceux-ci n'ont pas perdu leur virulence initiale et ils récupèrent leurs dimensions dès le premier ensemencement dans leur milieu ou le premier passage par les animaux sensibles.

Serpents et Microbes pathogènes ont ainsi une immunité réciproque manifeste, mais limitée, comme d'ailleurs toute immunité.